

NALAZ VIRUSA UVIJENOSTI LISTA TREŠNJE
(CHERRY LEAF ROLL VIRUS) U JUGOSLAVIJI

With Summary in English

ZLATA ŠTEFANAC

(iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu i Scottish Horticultural Research Institute u Invergowrie-u, Dundee)

Primljeno 5. 3. 1969.

Posebnu grupu biljnih virusa čine virusi NEPO tipa (Cadman 1963) koji su dobili ime po tome što ih prenose nematode (NE) i što imaju čestice poliedričkog oblika (PO). NEPO virusi lako se prenose sokom, imaju slična fizikalna svojstva i uzrokuju podjednake simptome na zeljastim pokusnim biljkama. Često se prenose sjemenkama i polenom (Lister i Murrant 1967, Murrant i Lister 1967) i tim se putem mogu očuvati i širiti u prirodi. Dobro su poznati ovi NEPO virusi: arabis mosaic, tobacco ringspot, raspberry ringspot, tomato ringspot, tomato black ring, cherry leaf roll, strawberry latent ringspot (usp. Lister 1964). Mnogi od ovih virusa izazivaju vrlo raširene i opasne bolesti ekonomski važnih biljaka. Tako je npr. za virus mozaika gušarke (arabis mosaic) poznato da osim bolesti na jagodama, kupinama i rabarbari uzrokuje još i bolest trešnje »cherry rasp leaf« (Cropely 1961 b) i bolesti vinove loze »grapevine yellow mosaic« (Cadman 1963, Dias i Harrison 1963).

U ovom radu izvještavamo o nalazu virusa uvijenosti lista trešnje (VULT) na području Jugoslavije. Ovaj virus izolirala sam iz bolesnih bazga (*Sambucus nigra* L.) koje su pronašli i opisali Plavšić-Banjac i Miličić (1968).

Materijal i metode

Iz listova bazge sa tamnozelenim vrpčama u području nerava i klorotičnim pjegama izolirala sam dva virusa Bz S i Bz I. Listovi su pripadali dvjema biljkama koje su rasle na različitim lokalitetima, jedna u Sarajevu, a druga u Ilidži kod Sarajeva. Ove viruse prenijela sam mehaničkom inokulacijom uz dodatak 0,01 M otopine natrijeva dietil-ditio-karbamata u fosfatnom puferu pH 7,5 na mlade sadnice bazge uzgojene iz sjemenki koje su potjecale od biljaka bez znakova virusne infekcije. Izolate Bz S i Bz I održavala sam na mladim bazgama koje su ujedno služile kao izvor virusnog soka za pokuse sa zeljastim test-biljkama.

Za serološka istraživanja imala sam na raspolaganju serume protiv sedam NEPO virusa koji su u »Uvodu« ovoga rada već spomenuti. Budući da sam u toku istraživanja naslutila da izolati Bz S i Bz I pripadaju VULT, nabavila sam dva seruma protiv ovog virusa. Prvi serum bio je priređen protiv soja izoliranog iz trešnje koja je bolovala od Eckelrader bolesti (Cadmán 1960), a drugi protiv soja VULT-a izoliranog iz rabarbare (Tomlinson i Walkey 1967). Serološki pokusi izvršeni su u agarozii.

Sok zaraženih biljaka *Chenopodium quinoa* i *Nicotiana clevelandi* nije uvijek sadržavao dovoljno virusa za stvaranje precipitacijskih linija u agar-gel difuzijskom pokusu. Virus je bilo dovoljno samo kroz nekoliko dana dok se živo razmnažao u biljkama. Zbog toga sam morala virus djelomično purifikirati. Postupak purifikacije izvršila sam na ovaj način:

Zaražene listove vrste *Nicotiana clevelandi* homogenizirala sam u omjeru 1:1,25 (g/ml) u smjesi 0,1 M askorbinske kiseline i 0,2 M Na_2HPO_4 (v/v) koja je sadržavala 0,1% tioglikolne kiseline i 0,5% 0,1 M etilen-diamin-tetra-octene kiseline. Nakon protiskivanja soka kroz gazu virus je pročišćen dodatkom jednakog volumena dietil-etera. Pomoću te metode pročišćavanja gubitak virusa bio je najmanji. Poslije mučkanja sa dietil-eterom odvojena je donja vodena faza koja je sadržavala virus. Grubi dijelovi uklonjeni su niskookretajnim centrifugiranjem od 10 min. (10 000 okretaja u 1 min.) nakon čega je virus oboren ultracentrifugiranjem kod 26 000 okretaja u 1 min. u trajanju od 120 min. u Spinco-rotoru 30. Virusni talog je otopljen u dest. vodi u 1/10 ishodne težine listova. Dio normalnih sastojaka stanice uklonjen je iz virusne otopine niskookretajnim centrifugiranjem.

Rezultati

Izolati Bz S i Bz I preneseni su u stakleniku mehanički na 12 različitim test-biljkama. Pokazalo se da oba izolata izazivaju iste simptome, na osnovi čega se moglo zaključiti da sadrže isti virus. To su potvrdili i serološki pokusi prilikom kojih su oba izolata pozitivno reagirala sa serumima protiv VULT. Simptomi na test-biljkama bili su slični onima koje prema literaturnim podacima prouzrokuju NEPO virusi.

Reakcije na test-biljkama

U tekstu koji slijedi detaljno su opisani simptomi na pojedinim test-biljkama.

Amaranthaceae

Celosia argentea L. Nakon 14 dana sistemična infekcija u obliku blagog mozaika.

Caprifoliaceae

Sambucus nigra L. Nakon tjedan dana prosvjetljivanja nerava na najmlađim listovima. Kasnije klorotične pjege razne veličine, tamnozelene vrpce u području nerava i klorotične šare (tab. 1 A).

Chenopodiaceae

Chenopodium amaranticolor Coste et Reyn. Nakon 4—7 dana na inokuliranim listovima nastanu nekrotične lezije s klorotičnim rubom (promjer lezija 1 do 1,5 mm). Gotovo istovremeno na najmlađim listovima mozaik i nekroze te uginuće vršnih listova.

Chenopodium quinoa Wild. Nakon 4—7 dana na inokuliranim listovima nekrotične ili u početku klorotične a zatim nekrotične lezije ili prstenovi. U toku daljnja 1—2 dana uginuće vršnih listova uz pojavu nekroza koje redovno nastaju pri bazi plojke.

Chenopodium murale L. Na inokuliranim listovima smeđe nekrotične lezije; na najmlađim listovima brojne nekrotične lezije. Uginuće vrška.

Chenopodium urticum L. Na inokuliranim listovima lokalne lezije. Sistemična infekcija kao i kod ostalih vrsta *Chenopodium*.

Cucurbitaceae

Cucumis sativus L. Nakon tjedan dana na inokuliranim kotiledonima manji broj slabo izraženih klorotičnih lezija promjera 2,5 mm. Nakon daljnja 4 dana sistemična infekcija praćena s klorotičnim pjegama i prstenovima.

Solanaceae

Nicotiana clevelandi Gray. Nakon 5—7 dana lokalne bijele nekrotične pjege i prstenovi. Poslije toga sistemična infekcija s pojavom nekroza uz nerve, pjega među nervima i nekrotičnih prstenova.

Nicotiana glutinosa L. Sistemična infekcija praćena laganim šarenilom.

Nicotiana tabacum L. White Burley. Nakon 2—5 dana na inokuliranim listovima malene lezije koje se razviju u nekrotične prstenove, često s isprekidanim koncentričkim linijama (tab. 1 B). Slični nekrotični prstenovi i pjege nastaju i na neinokuliranim listovima. Kasniji listovi ostaju bez simptoma.

Nicotiana tabacum L. Hicks resistant. Simptomi slični kao kod duhana White Burley.

Nicotiana tabacum L. Xanthii. Simptomi slični kao kod duhana White Burley.

Intenzitet simptoma ponešto varira ovisno o vanjskim faktorima. U pokusima, koji su bili izvršeni s razmjerno malo biljaka, nije nam pošlo za rukom inficirati vrste *Capsicum annuum* i *Gomphrena globosa* L.

Serološki pokusi

Virusni izolat iz bazge Bz I istražen je sa serumima protiv sedam NEPO virusa koji su u »Uvodu« već navedeni. Izolat je reagirao samo sa serumima protiv VULT-a.

Homologni titar seruma protiv soja VULT-a iz trešnje (T) i homologni titar seruma protiv soja VULT-a iz rabarbare (R) iznosili su 1 : 32, a heterologni titri obaju seruma s izolatom Bz I iznosili su 1 : 16. Serološke reakcije u agaru pokazale su stanovitu antigenu razliku između izolata Bz I i sojeva T i R VULT-a. Tako su u agar-gel difuzijskom pokusu nastajale jasne ostruge kad su izolat Bz I i soj T bili smješteni u susjedne bazene i kad su reagirali sa serumom protiv soja T (tab. 2). Isto tako je izolat Bz I stvarao ostrugu i sa sojem R kad su se ova dva virusa nalazila u susjednim bazenima i kad su reagirala sa serumom protiv soja R (tab. 2).

Oba izolata iz bazge, tj. Bz I i Bz S, bila su uspoređena međusobno pomoću seruma protiv R soja VULT-a. Pokazalo se da su ovi izolati serološki identični, jer su se u agar-gel difuzijskom pokusu njihove precipitacijske linije jedna s drugom povezivale.

Agar-gel difuzijski pokusi sa sojevima T i R i njihovim odgovarajućim serumima pokazali su da se ova dva soja serološki razlikuju, tj. da stvaraju jedan s drugima ostruge. Tomlinson i Walkey (1967) također su ustanovili serološku razliku između R izolata i Cropley-evog izolata iz trešnje. Ovaj posljednji izolat u našim pokusima nije pravio ostrugu sa izolatom T, nego su se njihove precipitacijske linije povezivale.

Diskusija

Posnette i Cropley (1955) opisali su uvijenost lista kao virusnu bolest trešnje (*Prunus avium*) u voćnjacima Kenta u Engleskoj. Listovi zaraženih trešanja uvijaju se prema gore, a istovremeno dolazi i do gumeze debela i ogranaka te do obamiranja grana počam od vrha. Detaljniju analizu virusa izvršio je Cropley (1961 a) ispitavši krug domadara, fizikalna svojstva i veličinu čestice i ustanovio njegovu sličnost sa NEPO virusima. Serološki pokusi pokazali su da se radi o zasebnom virusu.

Koliko je do danas poznato, VULT je prilično rasprostranjen i vezan za različite domadare. Osim iz trešnje u Engleskoj (Cropley 1961 a) i Holandiji (Cadmans 1960) virus je bio izoliran iz rabarbare (Tomlinson i Walkey 1967), a Schmelzer (1966) je pomoću analize na test-bilikama pronašao virus u vrstama *Sambucus racemosa* i *S. nigra* u Njemačkoj.

Čini se da je VULT prilično raširen na bazgi u Jugoslaviji, jer smo ne samo u okolici Sarajeva nego i u okolici Zagreba zapazili u više navrata virusne promjene na bazgi koje su bile vrlo slične onima što su ih izazivali izolati Bz I i Bz S.

VULT izoliran iz bazge razlikuje se serološki od soja iz trešnje i soja rabarbare. Prema tome, čini se, postoje najmanje tri soja VULT-a koji se serološki jedan od drugoga dosta razlikuju.

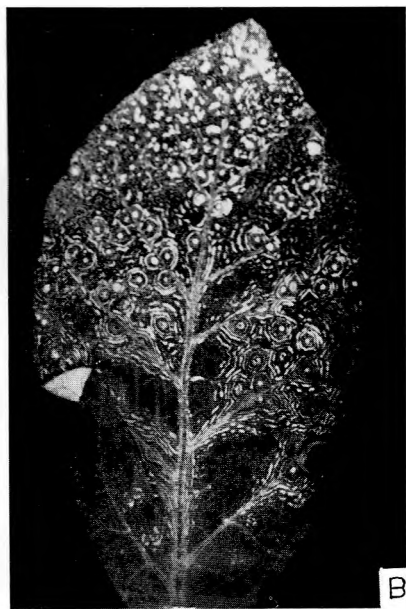
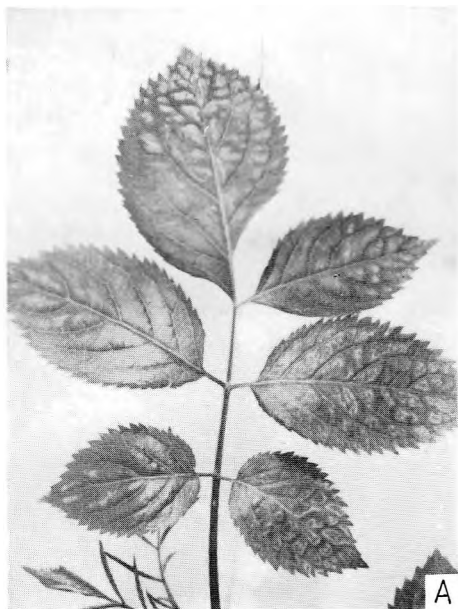


Tabla 1

Simptomi virusa uvijenosti lista trešnje (VULT) na sistemično inficiranom listu bazge (A) i na listu duhana White Burley (B)

Plate 1

Symptoms of cherry leaf roll virus (CLR) in systemically infected *Sambucus nigra* leaf (A) and in leaf of White Burley tobacco (B).

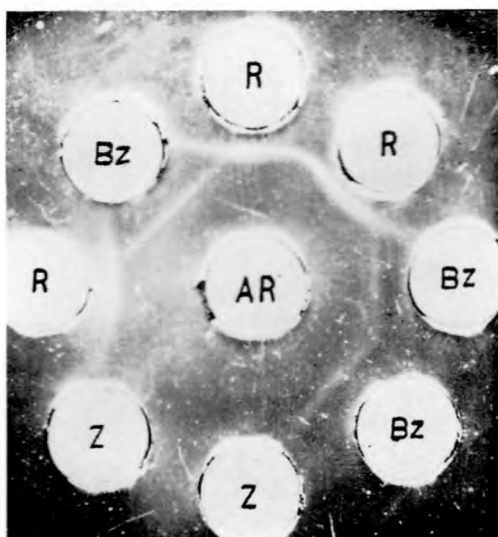
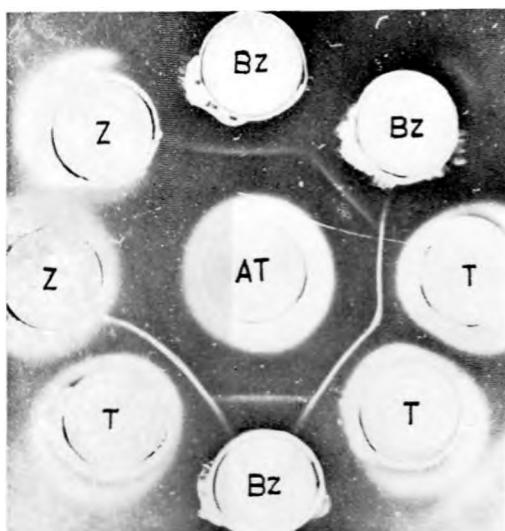


Tabla 2

Serološka reakcija u agar-gelu sa serumima protiv virusa uvijenosti lista trešnje. *AT* serum protiv soja iz trešnje, *T* soj iz trešnje, *AR* serum protiv soja rabarbare, *Bz* izolat iz bazge, *Z* sok zdrave biljke.

Plate 2

Gel diffusion serological reactions with sera against cherry leaf roll virus. *AT* cherry strain antiserum, *T* cherry strain of CLRV, *AR* rhubarb strain antiserum, *R* rhubarb strain of CLRV, *Bz* elder isolate, *Z* healthy plant sap.

Zaključak

Ovim radom ustanovila sam da je virus uvijenosti lista trešnje, koji dosada nije bio zabilježen za područje Jugoslavije, rasprostranjen i u našoj zemlji. Virus sam izolirala iz dvije bazge koje su potjecale iz Bosne. Izolati iz bazga stvarali su na test-biljkama simptome koji su tipični za virus uvijenosti lista trešnje. Osim toga sadržavali su neke zajedničke antigene grupe sa sojevima virusa uvijenosti lista trešnje koji su dobiveni iz trešnje (Cadman 1960) i rabarbare (Tomlinson i Walkey 1967), ali im nisu bili serološki identični.

Izražavam zahvalnost dru C. H. Cadmanu (Scottish Horticultural Research Institute, Invergowrie, Dundee) za korišćenje seruma protiv soja VULT-a iz trešnje i dru J. A. Tomlinsonu (National Vegetable Research Station, Wellesbourne, Warwick) za poslani virus i serum protiv soja VULT-a iz rabarbare. Za izradu fotografija seroloških reakcija zahvaljujem se Mr J. Sunderlandu.

Literatura

- Cadman, C. H., 1960: Soil-borne viruses. In Annu. Rep. Scot. Hort. Res. Inst. for 1959—1960, 48—53.
- Cadman, C. H., 1963: Biology of soil-borne viruses. Ann. Rev. Phytopathology 1, 143—172.
- Cropley, R., 1961 a: Cherry leaf-roll virus. Ann. appl. Biol. 49, 524—529.
- Cropley, R., 1961 b: Viruses causing rasp-leaf and similar diseases of sweet cherry. Ann. appl. Biol. 49, 530—534.
- Dias, H. F. and B. D. Harrison, 1963: The relationship between grapevine fan-leaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. Ann. appl. Biol. 51, 97—105.
- Lister, R. M., 1964: Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. Ann. appl. Biol. 54, 167—176.
- Lister, R. M., and A. F. Murant, 1967: Seed-transmission of nematode-borne viruses. Ann. appl. Biol. 59, 49—62.
- Murant, A. F., and R. M. Lister, 1967: Seed-transmission in the ecology of nematode-borne viruses. Ann. appl. Biol. 59, 63—76.
- Plavšić-Banjac, B., i D. Miličić, 1968: Neke nove viroze drveća u Jugoslaviji. Mikrobiologija 5, 65—72.
- Posnette, A. F., and R. Cropley, 1955: Leaf-roll: a virus disease of cherry. Rep. E. Malling Res. Sta. for 1954, 126—127.
- Schmelzer, K., 1966: Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 5. Mitteilung: Virose an *Populus* und *Sambucus*. Phytopathol. Z. 55, 415—427.
- Tomlinson, J. A., and D. G. A. Walkey, 1967: The isolation and identification of rhubarb viruses occurring in Britain. Ann. appl. Biol. 59, 415—427.

S U M M A R Y

OCCURENCE OF CHERRY LEAF ROLL VIRUS IN YUGOSLAVIA

Zlata Štefanac

(Botanical Institute of the University Zagreb)

Cherry leaf roll virus was found in Yugoslavia for the first time, in two plants of elder (*Sambucus nigra* L.) in Bosnia. The elder isolates produced symptoms typical of cherry leaf roll virus in test plants, and shared some, but not all, their antigenic determinants with strains originally obtained from Eckelrader-diseased cherry (C a d m a n 1960) or rhubarb (T o m l i n s o n and W a l k e y 1967).